

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-014596

(43)Date of publication of application : 20.01.1998

(51)Int.Cl. C12Q 1/30  
C12Q 1/40  
C12Q 1/48  
C12Q 1/61

(21)Application number : 08-174795

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 04.07.1996

(72)Inventor : HATTORI SHIZUO  
MASUDA YOSHIO  
KAWAMURA YOSHIHISA

## (54) MEASUREMENT OF COMPOSITION IN HUMOR AND REAGENT THEREFOR

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a reagent, capable of avoiding effects of an endogenous substance participating in an enzymic reactional system in a humor and accurately measuring the objective ingredient and excellent in stability.

**SOLUTION:** When a measuring ingredient in a humor are measured, an inhibiting substance contained in the humor is reacted with a reagent containing an enzyme capable of acting on the inhibiting substance or a substance derived from the inhibiting substance and producing hydrogen peroxide and a catalase of the genus *Bacillus* to scavenge the hydrogen peroxide produced from the inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance. The measuring ingredient in the humor is then reacted with a reagent containing an enzyme capable of acting on the measuring ingredient and producing the inhibiting substance, an enzyme capable of acting on the inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance and producing the hydrogen peroxide, a peroxidase and a chromogen to produce the inhibiting substance from the measuring ingredient in the humor and further hydrogen peroxide from the inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance and color the hydrogen peroxide. The coloring intensity thereof is then measured.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS****[Claim(s)]**

[Claim 1] To the interfering substance contained in body fluid in measuring the measurement component in body fluid The reagent containing the enzyme which acts on the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, and generates a hydrogen peroxide, and the catalase of Bacillus is made to act. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, Subsequently, the enzyme which acts on this measurement component and generates the interfering substance for the measurement component in body fluid, The oxidizing enzyme which acts on the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, and generates a hydrogen peroxide, Make the reagent containing a peroxidase and a chromogen act, and the interfering substance is made to generate from the measurement component in body fluid. The measuring method of the measurement component in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a hydrogen peroxide generate from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 2] In measuring the triglyceride in body fluid, in the glycerol contained in body fluid The glycerol kinase, A glycerol-3-phosphoric-acid oxidase and KATARAZE \*\* of Bacillus are made to act. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the glycerol, subsequently to the triglyceride in body fluid, the lipoprotein lipase, The glycerol kinase, a GURUSE roll-3-phosphoric-acid oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. The triglyceride measuring method in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a glycerol generate from a triglyceride, making a glycerol-3-phosphoric acid generate from a glycerol, making a hydrogen peroxide generate from a glycerol-3-phosphoric acid and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 3] In measuring the creatinine in body fluid, to the creatine contained in body fluid A creatine amidino hydrolase, A sarcosine oxidase and the catalase of Bacillus are made to act. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the creatine, subsequently to the creatinine in body fluid, creatinine amidohydrolase, A creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. The measuring method of the creatinine in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a creatine generate from a creatinine, making a sarcosine generate from a creatine, making a hydrogen peroxide generate from a sarcosine and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 4] Cholesterol oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the cholesterol contained in body fluid in measuring the cholesterol ester in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from cholesterol, subsequently to the cholesterol ester in body fluid, lipase, Cholesterol oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. The measuring method of the cholesterol ester in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making cholesterol generate from a cholesterol ester, making a hydrogen peroxide generate from cholesterol and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 5] A choline oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the choline contained in body fluid in measuring the phospholipid in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the choline, subsequently to the phospholipid in body fluid,

it is HOSUFO lipase. D, The measuring method of the phospholipid in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a choline oxidase, a peroxidase, and a chromogen act, making a choline generate from phospholipid, making a hydrogen peroxide generate from a choline and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 6] Xanthine oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the hypoxanthine contained in body fluid in measuring the inorganic phosphorus in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from HIPOKINCHIN, subsequently to the inorganic phosphorus in body fluid, an inosine and a purine-nucleotide phosphorylase, The measuring method of the inorganic phosphorus in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making xanthine oxidase, a peroxidase, and a chromogen act, making a hypoxanthine generate from inorganic phosphorus, making a hydrogen peroxide generate from a hypoxanthine and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 7] The pyruvate oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the pyruvic acid contained in body fluid in measuring GPT in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the pyruvic acid, subsequently to GPT in body fluid, L-alanine, An alpha ketoglutaric acid, the pyruvate oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. The measuring method of GPT in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a pyruvic acid generate from GPT, making a hydrogen peroxide generate from a pyruvic acid and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 8] A glucose oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the glucose in body fluid in measuring the alpha-amylase in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the glucose, subsequently to the alpha-amylase in body fluid, an amylase substrate, The alpha-amylase measuring method in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity after making a glucose oxidase, a peroxidase, and a chromogen act, making a glucose generate from the alpha-amylase, making a hydrogen peroxide generate from a glucose and making this hydrogen peroxide color.

[Claim 9] The measurement component measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the enzyme, the peroxidase, and the chromogen which act on the matter originating in the enzyme, this interfering substance, or this interfering substance which acts on the measurement component in the 1st reagent containing the oxidizing enzyme which acts on the matter originating in the enzyme or this interfering substance which acts on the interfering substance contained in body fluid, and generates a hydrogen peroxide, and generates a hydrogen peroxide, and the catalase of Bacillus, and body fluid, and generates the interfering substance, and generate a hydrogen peroxide

[Claim 10] The triglyceride measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing the glycerol kinase, a glycerol-3-phosphoric-acid oxidase, and the catalase of Bacillus and the lipoprotein lipase, the glycerol kinase, a GURUSE roll-3-phosphoric-acid oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 11] The measurement reagent of the creatinine in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, and the catalase of Bacillus and creatinine amidohydrolase, a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 12] The measurement reagent of the cholesterol ester in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing cholesterol oxidase and the catalase of Bacillus and lipase, cholesterol oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 13] The 1st reagent and HOSUFO lipase containing a choline oxidase and the catalase of Bacillus Measurement reagent of the phospholipid in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing D, a choline oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 14] The measurement reagent of the inorganic phosphorus in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing xanthine oxidase and the catalase of Bacillus, an inosine and a purine-nucleotide phosphorylase, xanthine oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 15] The measurement reagent of GPT which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing the pyruvate oxidase and the catalase of Bacillus and L-alanine, an

alpha ketoglutaric acid, the pyruvate oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[Claim 16] The alpha-amylase measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the 1st reagent containing a glucose oxidase and the catalase of Bacillus and an alpha-amylase substrate, a glucose oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to the reagent used for the method and this method of detecting an analysis object, after eliminating the hydrogen peroxide which originates in matter other than an analysis object (interfering substance) in the method of detecting an analysis object by measuring the hydrogen peroxide which generated the hydrogen peroxide and was generated, from the analysis object which exists in a sample using a catalase.

[0002]

[Description of the Prior Art] When detecting the analysis object in samples, such as body fluid, using an enzyme, generally the detection system of reaction has much system of reaction to which conjugate of the nicotinamide-adenine-dinucleotide(P) H which is a coenzyme about a dehydrogenase is carried out, and hydrogen-peroxide system of measurement to which conjugate of oxidizing enzyme and the peroxidase is carried out. The latter is the method of making oxidizing enzyme act on an analysis object or its resultant, and changing the hydrogen peroxide to generate for example, into quinone imine coloring matter by the peroxidase and the chromogen, and carrying out the spectrometry of this coloring matter, and carrying out colorimetry. Moreover, although oxidizing enzyme may be made to act on the analysis object directly when detecting an analysis object, in many cases, one more or more kinds of other enzymes other than oxidizing enzyme and a peroxidase are needed.

[0003] As an example which needs one or more kinds of other enzymes other than oxidizing enzyme for an analysis object, a triglyceride, a creatinine, a creatine, isolation cholesterol, a cholesterol ester, phospholipid, inorganic phosphorus, an amylase, GOT and GTP, a sialic acid, GUANAZE, etc. are mentioned.

[0004] The reaction of the above-mentioned analysis object is shown below.

GURIGURI ceride measurement      トリグリセリド  $\xrightarrow{\text{LPL}}$  グリセロール  $\xrightarrow{\text{GK}}$  グリセリン酸  $\xrightarrow{\text{G3O}}$   $\text{H}_2 \text{O}_2$

[0005] Creatinine measurement      クレアチニン  $\xrightarrow{\text{CNH}}$  クレアチン  $\xrightarrow{\text{CRH}}$  ザルコシン  $\xrightarrow{\text{SAO}}$   $\text{H}_2 \text{O}_2$

[0006] Cholesterol ester measurement      コレステロールエステル  $\xrightarrow{\text{COE}}$  遊離コレステロール  $\xrightarrow{\text{COO}}$   $\text{H}_2 \text{O}_2$

[0007] Phospholipid measurement      リン脂質  $\xrightarrow{\text{PLD}}$  コリン  $\xrightarrow{\text{CHO}}$   $\text{H}_2 \text{O}_2$

[0008] Inorganic-phosphorus measurement      無機リン + イノシン  $\xrightarrow{\text{PNP}}$  ヒポキサンテン  $\xrightarrow{\text{IXO}}$   $\text{H}_2 \text{O}_2$

[0009] The enzyme outlined by the above-mentioned formula is as follows.

LPL : Lipoprotein lipase GK : Glycerol-kinase G3O : Glycerol -3 - Phosphoric-acid oxidase  
CNH : Creatinine amidohydrolase (KUREACHININAZE)

CRH : Creatine amidino hydrolase (creatinase)

SAO : Sarcosine oxidase COE : Cholesterol esterase COO : Cholesterol oxidase PLD :

HOSUFO lipase DCHO : Choline oxidase PNP : Purine-nucleotide HOSUFORIRAZE XTO :

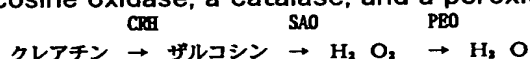
Xanthine oxidase [0010] In a sample including these analysis objects, for example, body fluid, the endogenicity matter which participates in the above-mentioned enzyme-reaction system exists, and producing a positive error in measurement of the target analysis object poses a problem. For example, a uric acid etc. is illustrated, when measuring a triglyceride, measuring an isolation glycerol and a creatinine, measuring a creatine and a sarcosine, and ester type cholesterol, measuring isolation cholesterol and phospholipid, measuring a choline and inorganic phosphorus, measuring a hypoxanthine and amylase activity, measuring a glucose, GOT, or GTP activity, measuring a pyruvic acid and a sialic acid and measuring a pyruvic acid and GUANAZE.

[0011] For example, a creatinine, especially the creatinine concentration in blood are the indexes of a renal-function trauma, and in creatinine measurement, if it converts into per weight of 1kg, influence is not received in a meal, movement, etc., but since the creatinine concentration in urine is fixed, it is used as a creatinine coefficient. However, the creatine which creatinine amidohydrolase acts on a creatinine and is generated also exists in the living body, and since especially creatine concentration participates, other disorders, for example, thyroid function trauma, when measuring a creatinine, the need of eliminating the creatine beforehand produces it. In order to eliminate an endogenicity creatine, the reagent for creatinine measurement of 2 reagent system which used the catalase is known (JP,4-34400,B).

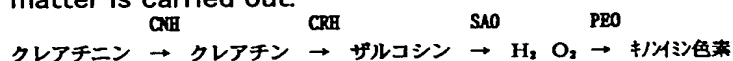
[0012] As a creatinine measurement reagent, what has the following composition, for example is mentioned.

Reagent R1: KUREACHINAMIJINOHIDORORAZEZARUKOSHI NOKISHIDAZE catalase  
peroxidase reagent R2: Creatinine amidohydrolase (peroxidase)

Chromogen [0013] That is, by the 1st enzyme reaction used for a reagent R1, the creatine in a sample is changed into the colorless matter by the reaction of a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a catalase, and a peroxidase, and is eliminated.



[0014] Subsequently, as the 2nd enzyme reaction, a reagent R2 is added in the system of a sample and a reagent R1, and it adds, and by the reaction of creatinine amidohydrolase, a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a catalase, a chromogen, and a peroxidase, the colored matter is generated from the creatinine in a sample, and the colorimetry of this matter is carried out.



[0015] Although the catalase which lives together in the 2nd enzyme reaction can block this enzyme reaction by adding the catalase inhibitor, it can attain the purpose, without reducing detection sensitivity from generally using a catalase by one to 10 times (activity value) of a peroxidase. Elimination of the hydrogen peroxide which originates similarly in detection of a triglyceride, inorganic-phosphorus measurement, etc. in addition to an analysis object like a creatinine is needed.

[0016]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] As a catalase used for the above-mentioned purpose, many enzymes of \*\*\*\* are used from the former. However, although thermal stability is 50 degrees C and the catalase of the \*\*\*\* origin has a good property, in composition of an analytical reagent, deactivating quickly has become clear. Moreover, the catalase of other animal origins and the catalase of the microorganism origin as well as the enzyme of the \*\*\*\* origin deactivate promptly in an analytical reagent.

[0017]

[Means for Solving the Problem] In order to solve the above-mentioned technical problem, as

a result of repeating research wholeheartedly, when the catalase of the bacteria origin belonging to Bacillus was used, holding activity stably also in composition of an analytical reagent made this invention persons clear.

[0018] In case this invention measures the measurement component in body fluid, to namely, the interfering substance contained in body fluid The reagent containing the oxidizing enzyme which acts on the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, and generates a hydrogen peroxide, and the catalase of Bacillus is made to act. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, Subsequently, the enzyme which acts on this measurement component and generates the interfering substance for the measurement component in body fluid, The enzyme which acts on the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, and generates a hydrogen peroxide, Make the reagent containing a peroxidase and a chromogen act, and the interfering substance is made to generate from the measurement component in body fluid. After making a hydrogen peroxide generate from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of the measurement component in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0019] Moreover, the enzyme which acts on the measurement component in the 1st reagent containing the oxidizing enzyme which acts on the matter originating in the enzyme or this interfering substance which this invention acts on the interfering substance contained in body fluid, and generates a hydrogen peroxide, and generates a hydrogen peroxide, and the catalase of Bacillus, and body fluid, and generates the interfering substance, It is a measurement component measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing the enzyme, peroxidase, and chromogen which act on the matter originating in this interfering substance or this interfering substance, and generate a hydrogen peroxide.

[0020]

[Example] In one embodiment of this invention measuring the triglyceride in body fluid The glycerol kinase, a glycerol-3-phosphoric-acid oxidase, and the catalase of Bacillus are made to act on the glycerol contained in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the glycerol, subsequently to the triglyceride in body fluid, the lipoprotein lipase, The glycerol kinase, a GURUSE roll-3-phosphoric-acid oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. Make a glycerol generate from a triglyceride and a glycerol-3-phosphoric acid is made to generate from a glycerol. After making a hydrogen peroxide generate from a glycerol-3-phosphoric acid and making this hydrogen peroxide color, it is a triglyceride measuring method in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0021] There is a triglyceride measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent which contains the 1st reagent containing the glycerol kinase, a glycerol-3-phosphoric-acid oxidase, and the catalase of Bacillus and the lipoprotein lipase, the glycerol kinase, a GURUSE roll-3-phosphoric-acid oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method.

[0022] Moreover, are in charge of another embodiment of this invention measuring the creatinine in body fluid. A creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, and the catalase of Bacillus are made to act on the creatine contained in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the creatine, subsequently to the creatinine in body fluid, creatinine amidohydrolase, A creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. After making a creatine generate from a creatinine, making a sarcosine generate from a creatine, making a hydrogen peroxide generate from a sarcosine and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of the creatinine in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0023] There is a measurement reagent of the creatinine in the body fluid which consists of the 2nd reagent which contains the 1st reagent containing a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, and the catalase of Bacillus and a creatinine amidino hydrolase, a creatine amidino hydrolase, a sarcosine oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method.

[0024] Furthermore, are in charge of one embodiment of this invention measuring the cholesterol ester in body fluid. Cholesterol oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the cholesterol contained in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from cholesterol, subsequently to the cholesterol ester in body fluid, lipase, Cholesterol oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. After making cholesterol generate from a cholesterol ester, making a hydrogen peroxide generate from cholesterol and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of the cholesterol ester in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0025] There is a measurement reagent of the cholesterol ester in the body fluid which consists of the 2nd reagent which contains the 1st reagent which contains cholesterol oxidase and the catalase of Bacillus in cholesterol and lipase, cholesterol oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method.

[0026] In case another embodiment of this invention measures the phospholipid in body fluid, the catalase of choline OKISHIZE and Bacillus is made to act on the choline contained in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the choline, subsequently to the phospholipid in body fluid, it is HOSUFO lipase. D, After making a choline oxidase, a peroxidase, and a chromogen act, making a choline generate from phospholipid, making a hydrogen peroxide generate from a choline and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of the phospholipid in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0027] As a reagent used for the above-mentioned method, it is the 1st reagent and HOSUFO lipase containing a choline oxidase and the catalase of Bacillus. There is a measurement reagent of the phospholipid in the body fluid which consists of the 2nd reagent containing D, a choline oxidase, a peroxidase, and a chromogen.

[0028] Moreover, are in charge of one embodiment of this invention measuring the inorganic phosphorus in body fluid. Xanthine oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the hypoxanthine contained in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from HIPOKINCHIN, subsequently to the inorganic phosphorus in body fluid, an inosine and a purine-nucleotide phosphorylase, Xanthine oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. After making a hypoxanthine generate from inorganic phosphorus, making a hydrogen peroxide generate from a hypoxanthine and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of the inorganic phosphorus in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0029] There is a measurement reagent of the inorganic phosphorus in the body fluid which consists of the 2nd reagent which contains the 1st reagent containing xanthine oxidase and the catalase of Bacillus, an inosine and purine-nucleotide FOFORIRAZE, xanthine oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method.

[0030] In case another embodiment of this invention measures GPT in body fluid, to the pyruvic acid contained in body fluid The pyruvate oxidase, And after eliminating the hydrogen peroxide which the catalase of Bacillus was made to act and was generated from the pyruvic acid, To GPT in body fluid, subsequently, L-alanine, an alpha ketoglutaric acid, pyruvate oxidase, After making a peroxidase and a chromogen act, making a pyruvic acid generate from GPT, making a hydrogen peroxide generate from a pyruvic acid and making this hydrogen peroxide color, it is the measuring method of GPT in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0031] There is a measurement reagent of GPT which consists of the 2nd reagent which contains the pyruvate oxidase, the 1st reagent containing the catalase of Bacillus and L-alanine, an alpha ketoglutaric acid, the pyruvate oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method.

[0032] In one embodiment of this invention measuring the alpha-amylase in body fluid A glucose oxidase and the catalase of Bacillus are made to act on the glucose in body fluid. After eliminating the hydrogen peroxide generated from the glucose, subsequently to the alpha-amylase in body fluid, an amylase substrate, A glucose oxidase, a peroxidase, and a chromogen are made to act. After making a glucose generate from the alpha-amylase, making a hydrogen peroxide generate from a glucose and making this hydrogen peroxide color, it is an



alpha-amylase measuring method in the body fluid characterized by measuring the coloring intensity.

[0033] There is an alpha-amylase measurement reagent in the body fluid which consists of the 2nd reagent which contains the 1st reagent containing a glucose oxidase and the catalase of Bacillus and an alpha-amylase substrate, a glucose oxidase, a peroxidase, and a chromogen as a reagent used for the above-mentioned method. As a substrate, oligosaccharides, such as maltotetraose, maltopentaose, and malto heptaose, those nonreduction end ornamentation oligosaccharides, etc. exist.

[0034] As a sample in this invention, there is body fluid, such as urine, a blood serum, saliva, and a pancreatic juice. Moreover, anything is applicable if what originates in matter other than an object in the sample, and generates a hydrogen peroxide as an analysis object is contained. For example, although a creatinine, a triglyceride, and inorganic phosphorus are typical, a creatine, a cholesterol ester, a sialic acid, the alpha-amylase, GOT and GPT, GUANAZE, phospholipid, etc. can be mentioned to others.

[0035] As an enzyme which acts on the interfering substance used for this invention, and generates a hydrogen peroxide, there are cholesterol oxidase, a glucose oxidase, xanthine oxidase, a choline oxidase, a sarcosine oxidase, a pyruvic-acid oxidase, etc., for example.

[0036] The matter which originates in the interfering substance in this invention is matter which an enzyme or a substrate, and other matter are made to act on the interfering substance, and is generated, and this matter generates a hydrogen peroxide with the enzyme which acts on this matter. For example, a glycerol-3-phosphoric acid, a sarcosine, a xanthin, etc. are mentioned.

[0037] As long as it is the oxidizing enzyme which there are a glycerol-3-phosphoric-acid oxidase, a sarcosine oxidase, cholesterol oxidase, xanthine oxidase, a choline oxidase, a pyruvic-acid oxidase, a glucose oxidase, a uricase, a glycerol oxidase, etc., and generates a hydrogen peroxide as an enzyme which acts on the matter which originates in the interfering substance in this invention, and generates a hydrogen peroxide, the thing of what the origin may be used.

[0038] As an enzyme which acts on the measurement component used for this invention, and generates the interfering substance, a GURIRO kinase, lipase, lipoprotein lipase, HOSUFO lipase D, creatinine amidohydrolase, a creatine amidino hydrolase, a purine-nucleotide phosphorylase, etc. are mentioned.

[0039] As long as the catalases used for this invention are the Bacillus bacteria as the origin, the thing of what the origin may be used for them. Especially a suitable thing has the thing of Bacillus stearothermophilus (Bacillus stearothermophilus), bacillus Subtilis (Bacillus subtilis), and the bacillus cardo TENAKKUSU (Bacillus cardotenax) origin. Especially the thing of the bacillus SUTEARO thermofilus (Bacillus stearothermophilus) IFO12550, IFO12983, IFO13737, and ATCC12016 and the IAM11001 origin is desirable also in these.

[0040] The catalase used for this invention cultivates suitable bacillus SUTEARO thermofilus, for example, and refines it from this culture. As such a method, there is a method indicated by JP,63-207384,A, for example. As a culture medium used in cultivation of a catalase production bacillus, what carries out proper quantity content of the carbon source in which use strain can carry out utilization, a nitrogen object, and the other required nutrients can be used, even if it is a synthetic medium or a natural medium. Usually performing cultivation by shaking culture or the aeration spinner culture, cultivation temperature performs 40-60 degrees C and cultivation pH in 5-9. Incubation period will be grown in one - five days, and production accumulation of the catalase will be carried out into a biomass.

[0041] The purification method of the catalase used for this invention can be performed as follows, for example. Mechanical crush using ultrasonic crush, a glass bead, etc. as an extraction method from a biomass, a French press, and surfactant processing are mentioned. Furthermore about an extract, it can refine by the ion-exchange chromatography methods, such as condensation methods, such as metal condensation methods, such as salting-out methods, such as ammonium-sulfate boorish \*\*\*\*, a magnesium chloride, and a calcium chloride, a protamine, and polyethyleneimine, and also DEAE(diethyl aminomethyl)-sepharose,

and CM(carboxymethyl)-sepharose, etc. Thus, the obtained catalase can usually be obtained more than by specific activity 100U/mg.

[0042] As a peroxidase used for this invention, there are vegetation including a horseradish and a thing of the various microorganism origins.

[0043] As a chromogen used for this invention, as long as it produces change of absorption in spectroscopy with a hydrogen peroxide, what thing may be used. It can consider a 4-amino antipyrin, an aniline derivative and a 4-amino antipyrin, a phenol derivative, 3-methyl-2-benzothiazoline and an aniline derivative or 4-amino antipyrin independence, aniline derivative independence, and a phenol derivative independent under existence of a peroxidase. As an aniline derivative, aniline, N,N-dimethylaniline, N, and N-diethylaniline, An N and N-diethyl-m-torr gin, N, and N-dimethyl-m-anisidine, N-ethyl-(3-methylphenyl)-N'-acetyl ethylenediamine, N-ethyl [ - N / -(2-hydroxy-3-sulfoethyl)- Meta toluidine, ] - N -(beta-hydroxyethyl)- Meta toluidine, N-ethyl N-ethyl-N-sulfo propyl-meta toluidine, the N-ethyl-sulfo propyl -3, 5-methoxyaniline, There are N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo propyl)-3, 5-dimethoxy aniline, an N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo propyl)-m-anisidine, etc. As a phenol derivative, there are a phenol, p-chlorophenol, 2, 4-dichlorophenol, 2, 4-dibromophenol, 2 and 3, a 4-trichlorophenol, etc.

[0044] The enzyme and this catalase which the enzyme which acts on this interfering substance and generates a hydrogen peroxide, and the catalase of Bacillus are made to act on the interfering substance contained in body fluid in measuring the measurement component in body fluid first by this invention, or guide other matter from this interfering substance, act on this matter, and generate a hydrogen peroxide are made to act, and the hydrogen peroxide generated from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance is eliminated. Subsequently, after making the reagent containing the enzyme, the peroxidase, and the chromogen which act on the matter originating in the enzyme, this interfering substance, or this interfering substance which acts on this measurement component and generates the interfering substance, and generate a hydrogen peroxide act on the measurement component in body fluid, making the interfering substance generate from the measurement component in body fluid, making a hydrogen peroxide generate from the matter originating in this interfering substance or this interfering substance and making this hydrogen peroxide color, the coloring intensity measures.

[0045] After making a hydrogen peroxide color, as a method of measuring the coloring intensity, it usually carries out to measurement of the generated quinone coloring matter by spectrometry with a wavelength of 540-650nm. As a measuring method, it carries out by law and the rate method.

[0046] the measurement reagent of this invention -- usually -- from 2 reagent system -- changing -- a chromogen -- 4-amino antipyrin or 3-methyl-2-benzothiazolyl non -- the case where it consists of a hydrazine, etc. an aniline derivative, or a phenol derivative -- the inside of it, one sort, preferably, although an aniline derivative or a phenol derivative must be contained in the 2nd reagent, other one sort may be contained in either the 1st reagent or the 2nd reagent

[0047] In the case of 2 reagent system, in this invention, the substrate of the oxidizing enzyme which acts on the 1st reagent and the 2nd reagent according to a peroxidase, the buffer solution, and the need at a measurement component in addition to the aforementioned component, and generates a hydrogen peroxide, enzymes other than a peroxidase, and these enzymes, a surfactant, a stabilizing agent, the various interfering substance, etc. may be included. a peroxidase -- the 1st -- the 1st reagent is preferably better although it may be contained in whichever the 2nd reagent

[0048]

[Effect of the Invention] By this invention, the hydrogen-peroxide elimination reagent excellent in mothball nature is obtained. The liquefied and stable reagent is very useful like these now when a liquefaction reagent is mainstream.

[0049]

[Example] Hereafter, an example is given and this invention is shown concretely.

The following solution was produced as an example 1 creatinine-measurement reagent. The 1st reagent Creatine amidino hydrolase 65U/ml A sarcosine oxidase 25U/ml A catalase 120U/ml A peroxidase 5U/ml A PIPES buffer 0.1M, pH 6.8 Cholic-acid sodium 0.1% triton X-100 0.1% EDTA 0.01% [0050]

The 2nd reagent Creatinine amidohydrolase 200U/ml A 4-amino antipyrin 1.4mM(s) EHSPT 2.0mM(s) A PIPES buffer, 0.1M, pH 6.8 Cholic-acid sodium 0.1% Triton X-100 0.1% EDTA 0.01% [0051] The catalase was prepared by the method better known than *Bacillus stearothermophilus* (*Bacillus stearothermophilus*) IAM11001. It mixed with 8micro of samples I which contain creatine 1 mg/dl for a creatine, respectively, including 2, 4, 6, and 8 mg/dl with the 300micro of the 1st reagent I, and 37 degrees C of absorbances were measured by 555nm, after being carried out for 5 minutes (Abs1). Furthermore it mixed with the 100micro of the 2nd reagent I, and it was made to react for 5 minutes and 37 degrees C of absorbances were measured by 555nm (Abs2). The creatinine value in a sample was computed by comparing each value of Abs2-Abs1 with the value of the creatinine standard solution of 5 mg/dl ( drawing 1 ). This reagent was not influenced of the creatine to 8 mg/dl, but it was checked that the creatine in a sample is eliminated by the creatinine, the sarcosine oxidase, and the catalase.

[0052] The 1st reagent produced in the example 2 example 1 was saved at 25 degrees C and 40 degrees C, and residual catalase activity was measured on 1, 2, 3, 4, and the 7th. In addition, the catalase was produced by the following methods. 16mM(s) 0.25ml of hydrogen-peroxide solutions was taken in the test tube, and preliminary warming was carried out for 5 minutes at 25 degrees C, and 0.25ml of enzyme liquid was added and it mixed with it. Correctly, for 5 minutes and after keeping it warm at 25 degrees C, 2.5ml of titanium reagents was added, the reaction was stopped, and contrast was asked for the absorbance of 410nm for water (ODtest). Enzyme liquid was added, after mixing with 2.5ml of titanium reagents with the hydrogen-peroxide solution simultaneously and keeping it warm for 5 minutes at 25 degrees C (ODblank). Catalase 1 unit was made into the amount of enzymes which disassembles the hydrogen peroxide of one micromole in 1 minute. The result is shown in drawing 2 .

[0053] The solution of composition of an example 1 was produced as an example of comparison 1 creatinine-measurement reagent. However, the enzyme of commercial \*\*\*\* was used as a catalase. The result is shown in drawing 3 .

[0054] The solution of composition of an example 1 was produced as an example of comparison 2 creatinine-measurement reagent. However, the enzyme of the commercial *Aspergillus* origin was used as a catalase. The result of drawing 3 and the example 2 of comparison is shown [ the result of this invention ] for the result of drawing 2 and the example 1 of comparison in drawing 4 . The catalase of *Bacillus* was preservation for 40 degrees C and seven days, to 50% of residual activity being shown, by the catalase of the \*\*\*\* origin, 0%, it did not pass for 20% of residual activity to be shown, but the stability in the inside of the creatinine measurement reagent of the catalase of *Bacillus* was shown by the catalase of the *Aspergillus* origin so that clearly from these drawings.

---

[Translation done.]

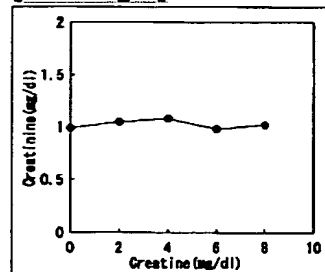
## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

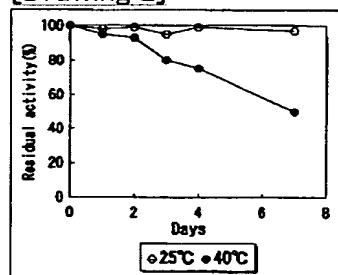
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect th original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

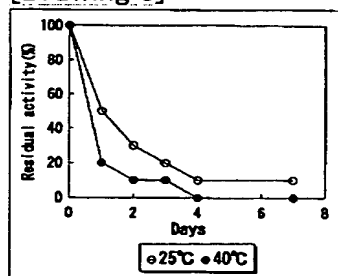
[Drawing 1]



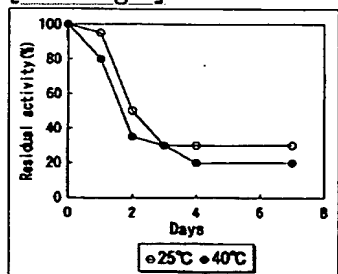
[Drawing 2]



[Drawing 3]



[Drawing 4]



[Translation done.]

【効果】体液中の酵素反応系に關与する内因性の物質の影響を回避して、目的成分を正確に測定することができる安定性に優れた試薬が得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中の測定成分を測定するに当たり、体液中に含まれる妨害物質に、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素およびバチルス属のカタラーゼを含む試薬を作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の測定成分に、該測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の測定成分の測定法。

【請求項2】 体液中のトリグリセリドを測定するに当たり、体液中に含まれるグリセリンにグリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グリセリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のトリグリセリドにリボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、トリグリセリドからグリセリンを生成させ、グリセリンからグリセロール-3-リン酸を生成させ、グリセロール-3-リン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のトリグリセリド測定法。

【請求項3】 体液中のクレアチニンを測定するに当たり、体液中に含まれるクレアチンにクレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、クレアチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のクレアチニンにクレアチンアミドヒドラーゼ、クレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、クレアチンからクレアチンを生成させ、クレアチンからザルコシンを生成させ、ザルコシンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のクレアチニンの測定法。

【請求項4】 体液中のコレステロールエステルを測定するに当たり、体液中に含まれるコレステロールにコレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コレステロールから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のコレステロールエステルにリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、コレステロールからコレステロールを生成させ、コレステロールから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の

コレステロールエステルの測定法。

【請求項5】 体液中のリン脂質を測定するに当たり、体液中に含まれるコリンにコリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のリン脂質にホスホリパーゼ D、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、リン脂質からコリンを生成させ、コリンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のリン脂質の測定法。

【請求項6】 体液中の無機リンを測定するに当たり、体液中に含まれるヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ヒポキサンチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の無機リンにイノシンおよびプリンヌクレオチドフォスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、無機リンからヒポキサンチンを生成させ、ヒポキサンチンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の無機リンの測定法。

【請求項7】 体液中のGPTを測定するに当たり、体液中に含まれるビルビン酸にビルビン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ビルビン酸から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のGPTにL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、GPTからビルビン酸を生成させ、ビルビン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のGPTの測定法。

【請求項8】 体液中の $\alpha$ -アミラーゼを測定するに当たり、体液中のグルコースにグルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グルコースから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の $\alpha$ -アミラーゼにアミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、 $\alpha$ -アミラーゼからグルコースを生成させ、グルコースから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定法。

【請求項9】 体液中に含まれる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含有する第1試薬および体液中の測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含有する第2試薬からなる体液中の測定成分測定試薬。

【請求項10】 グリセロールキナーゼ、グリセロール

ー3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロールー3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のトリグリセリド測定試薬。

【請求項11】 クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のクレアチニンの測定試薬。

【請求項12】 コレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のコレステロールエステルの測定試薬。

【請求項13】 コリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびホスホリパーゼD、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のリン脂質の測定試薬。

【請求項14】 キサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびイノシンおよびプリンヌクレオチドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の無機リンの測定試薬。

【請求項15】 ビルビン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなるGPTの測定試薬。

【請求項16】 グルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬および $\alpha$ -アミラーゼ

基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

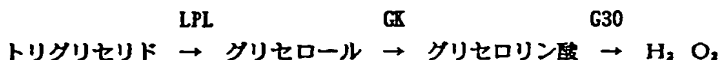
【発明の属する技術分野】本発明は試料中に存在する分析対象物から過酸化水素を生成し、生成した過酸化水素を測定することにより、分析対象物を検出する方法において、分析対象物以外の物質（妨害物質）に由来する過酸化水素をカタラーゼを用いて消去した後、分析対象物を検出する方法および該方法に使用する試薬に関する。

【0002】

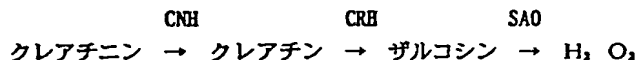
【従来の技術】体液などの試料中の分析対象物を酵素を用いて検出する場合、その検出反応系は脱水素酵素を補酵素であるNAD(P)Hとを共役させる反応系と、酸化酵素とペルオキシダーゼを共役させる過酸化水素測定系が一般的に多い。後者は分析対象物またはその反応生成物に酸化酵素を作用させ、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと色原体により、例えばキノンイミン色素に変え、該色素を吸光度測定して比色定量する方法である。また、分析対象物を検出する場合、その分析対象物に直接、酸化酵素を作用させる場合もあるが、多くの場合は、酸化酵素およびペルオキシダーゼの他に、更に1種類以上の他の酵素を必要とする。

【0003】分析対象物に酸化酵素の他に1種類以上の他の酵素を必要とする例として、トリグリセリド、クレアチニン、クレアチン、遊離コレステロール、コレステロールエステル、リン脂質、無機リン、アミラーゼ、GOT、GTP、シアル酸、グアナーゼなどが挙げられる。

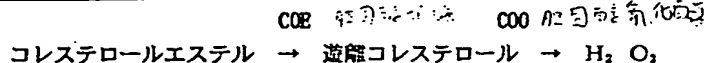
【0004】上記分析対象物の反応を下記に示す。  
トリグリセリド測定



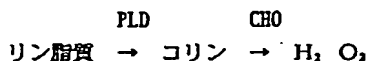
【0005】クレアチニン測定



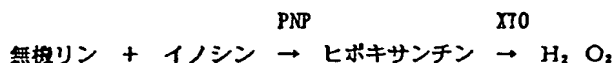
【0006】コレステロールエステル測定



【0007】リン脂質測定



【0008】無機リン測定



【0009】上記式にて、略記した酵素は、以下の通りである。

LPL：リボプロテインリパーゼ

GK：グリセロールキナーゼ

G30：グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ

50 CNH：クレアチニンアミドヒドロラーゼ（クレアチニナ

ーゼ)

CRH : クレアチンアミジノヒドロラーゼ (クレアチナーゼ)

SAO : ザルコシンオキシダーゼ

COE : コレステロールエステラーゼ *cholesterol esterase*

COO : コレステロールオキシダーゼ *cholesterol oxidase*

PLD : ホスホリパーゼ D

CHO : コリンオキシダーゼ

PNP : プリンヌクレオチドホスホリラーゼ

XTD : キサンチンオキシダーゼ

【0010】これらの分析対象物を含む試料、例えば体液中には上記酵素反応系に関与する内因性の物質が存在し、目的的分析対象物の測定に正の誤差を生じることが問題となる。例えばトリグリセリドを測定する場合、遊離グリセロール、クレアチニンを測定する場合、クレアチンおよびザルコシン、エステル型コレステロールを測定する場合、遊離コレステロール、リン脂質を測定する場合、コリン、無機リンを測定する場合、ヒポキサンチン、アミラーゼ活性を測定する場合、グルコース、GOTまたはGTP活性を測定する場合、ヒルビン酸、シアル酸を測定する場合、ヒルビン酸、グアナーゼを測定する場合、尿酸などが例示される。

【0011】例えばクレアチニン測定では、クレアチニン、特に血中クレアチニン濃度は腎機能傷害の指標であり、また、尿中クレアチニン濃度は体重1kgあたりに

CRH

クレアチン → ザルコシン

【0014】次いで第2酵素反応として、試薬R2を試料および試薬R1の系に添加して、添加し、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラー

CNH

CRH

クレアチニン → クレアチン

【0015】第2酵素反応に共存するカタラーゼは、そのカタラーゼ阻害剤を添加することにより該酵素反応をブロックできるが、一般にカタラーゼをペルオキシダーゼの1~10倍(活性値)で使用するより検出感度を低下させずに目的を達成することができる。クレアチニンと同様にトリグリセリド、無機リン測定などの検出においても同様に分析対象物以外に由来する過酸化水素の消去が必要とされる。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】上記目的に使用されるカタラーゼとしては、従来から牛肝の酵素が多く使用されている。しかしながら、牛肝由来のカタラーゼは熱安定性が50℃であって、良好な性質を有するが、分析試薬の組成中では急速に失活することが判明している。また、他の動物起源のカタラーゼ、微生物由来のカタラーゼも牛肝由来の酵素と同様に分析試薬中で速やかに失活する。

【0017】

10

換算すると食事、運動等に影響を受けず一定であるのでクレアチニン係数として利用されている。ところがクレアチニンにクレアチニンアミドヒドロラーゼが作用して生成するクレアチンも生体内に存在し、特にクレアチン濃度は他の疾患、例えば甲状腺機能傷害に関与するのでクレアチニンを測定する場合、あらかじめクレアチンを消去しておく必要性が生じる。内因性のクレアチンを消去するために、カタラーゼを用いた2試薬系のクレアチニン測定用試薬が知られている(特公平4-34400号公報)

【0012】クレアチニン測定試薬としては、例えば下記組成を有するものが挙げられる。

試薬R1 : クレアチンアミジノヒドロラーゼ

ザルコシンオキシダーゼ

カタラーゼ

ペルオキシダーゼ

試薬R2 : クレアチニンアミドヒドロラーゼ

(ペルオキシダーゼ)

色原体

20

【0013】つまり、試薬R1に用いる第1酵素反応で、試料中のクレアチンをクレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、カタラーゼおよびペルオキシダーゼの反応により無色の物質に変換して消去する。

SAO

PEO

$H_2O_2 \rightarrow H_2O$

ぜ、ザルコシンオキシダーゼ、カタラーゼ、色原体およびペルオキシダーゼの反応により、試料中のクレアチニンから有色物質を生成し、該物質を比色定量する。

30

SAO

PEO

ザルコシン →  $H_2O_2 \rightarrow$  キノミン色素

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、バチルス属に属する細菌由来のカタラーゼを用いると、分析試薬の組成中でも安定に活性を保持していることが判明した。

【0018】すなわち、本発明は体液中の測定成分を測定するに当たり、体液中に含まれる妨害物質に、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含む試薬を作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の測定成分に、該測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の測定成分の測定法であ

50



る。

【0019】また、本発明は体液中に含まれる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含有する第1試薬および体液中の測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含有する第2試薬からなる体液中の測定成分測定試薬である。

【0020】

【発明の実施態様】本発明の一実施態様は、体液中のトリグリセリドを測定するに当たり、体液中に含まれるグリセリンにグリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グリセリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のトリグリセリドにリボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、トリグリセリドからグリセリンを生成させ、グリセリンからグリセロール-3-リン酸を生成させ、グリセロール-3-リン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のトリグリセリド測定法である。

【0021】上記方法に使用する試薬としては、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のトリグリセリド測定試薬がある。

【0022】また、本発明の別な実施態様は、体液中のクレアチンを測定するに当たり、体液中に含まれるクレアチンにクレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、クレアチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のクレアチンにクレアチンアミドヒドラーゼ、クレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、クレアチンからクレアチンを生成させ、クレアチンからザルコシンを生成させ、ザルコシンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のクレアチンの測定法である。

【0023】上記方法に使用する試薬としては、クレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびクレアチンアミジノヒドラーゼ、クレアチンアミジノヒドラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダー

ゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のクレアチニンの測定試薬がある。

【0024】さらに、本発明の一実施態様は、体液中のコレステロールエステルを測定するに当たり、体液中に含まれるコレステロールにコレステロールオキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コレステロールから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のコレステロールエステルにリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、コレステロールエステルからコレステロールを生成させ、コレステロールから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のコレステロールエステルの測定法である。

【0025】上記方法に使用する試薬としては、コレステロールにコレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のコレステロールエステルの測定試薬がある。

【0026】本発明の別な実施態様は、体液中のリン脂質を測定するに当たり、体液中に含まれるコリンにコリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のリン脂質にホスホリパーゼ D、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、リン脂質からコリンを生成させ、コリンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のリン脂質の測定法である。

【0027】上記方法に使用する試薬としては、コリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびホスホリパーゼ D、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のリン脂質の測定試薬がある。

【0028】また、本発明の一実施態様は、体液中の無機リンを測定するに当たり、体液中に含まれるヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ヒポキサンチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の無機リンにイノシンおよびプリンヌクレオチドフォスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、無機リンからヒポキサンチンを生成させ、ヒポキサンチンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の無機リンの測定法である。

【0029】上記方法に使用する試薬としては、キサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびイノシンおよびプリンヌクレオチドフォスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダー

10

20

30

40

50

ーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の無機リンの測定試薬がある。

【0030】本発明の別な実施態様は、体液中のGPTを測定するに当たり、体液中に含まれるビルビン酸にビルビン酸オキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ビルビン酸から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のGPTにL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、GPTからビルビン酸を生成させ、ビルビン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のGPTの測定法である。

【0031】上記方法に使用する試薬としては、ビルビン酸オキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなるGPTの測定試薬がある。

【0032】本発明の一実施態様は、体液中の $\alpha$ -アミラーゼを測定するに当たり、体液中のグルコースにグルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グルコースから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の $\alpha$ -アミラーゼにアミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、 $\alpha$ -アミラーゼからグルコースを生成させ、グルコースから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定法である。

【0033】上記方法に使用する試薬としては、グルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬および $\alpha$ -アミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定試薬がある。基質としては、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘptaオースなどのオリゴ糖やそれらの非還元末端修飾オリゴ糖などがある。

【0034】本発明における試料としては、尿、血清、唾液、唾液などの体液がある。また、分析対象物としては、その試料中に対象物以外の物質に起因して過酸化水素を発生するものを含有するものであれば、何でも適用可能である。例えばクレアチニン、トリグリセリド、無機リンが代表的であるが、他にクレアチン、コレステロールエステル、シアル酸、 $\alpha$ -アミラーゼ、GOT、GPT、グアナーゼ、リン脂質などを挙げることができる。

【0035】本発明に用いる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素としては、例えばコレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼなどがある。

【0036】本発明において妨害物質に由来する物質と

は、妨害物質に酵素または基質および他の物質を作用させて生成する物質であって、該物質は該物質に作用する酵素によって過酸化水素を生成するものである。例えばグリセロール-3-リン酸、ザルコシン、キサンチンなどが挙げられる。

【0037】本発明において妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素としては、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウリカーゼ、グリセロールオキシダーゼなどがあり、過酸化水素を発生する酸化酵素であれば、いかなる起源のものでも良い。

【0038】本発明に使用する測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素としては、グリコキナーゼ、リパーゼ、リボプロテインリパーゼ、ホスホリパーゼD、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、プリンヌクレオチドフォスホリラーゼなどが挙げられる。

【0039】本発明に使用するカタラーゼは、その起源としてバチルス属細菌であれば、いかなる起源のものをを用いても良い。特に好適なのはバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・カルドテナックス (*Bacillus cardotenax*)由来のものがある。これらの中でもバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) IF012550、IF012983、IF013737、ATCC12016、IAM11001由来のものが特に好ましい。

【0040】本発明に用いるカタラーゼは、例えば好適なバチルス・ステアロサーモフィラスを培養し、該培養物から精製する。このような方法としては、例えば特開昭63-207384号公報に記載される方法がある。カタラーゼ生産菌の培養にあたって使用する培地としては、使用菌株が資化しうる炭素源、窒素源、その他必要な栄養素を適量含有するものを、合成培地、天然培地のいずれかであっても使用できる。培養は通常、振とう培養あるいは通気攪拌培養で行い、培養温度は40~60℃、培養pHは5~9の範囲で行う。培養期間は1~5日で生育し、菌体内にカタラーゼが生産蓄積される。

【0041】本発明に使用するカタラーゼの精製法は、例えば以下の様に行うことができる。菌体からの抽出法として、超音波破砕、ガラスビーズなどを用いる機械的な破砕、フレンチプレス、界面活性剤処理が挙げられる。さらに抽出液については、硫酸やほう酸などの塩析法、塩化マグネシウムや塩化カルシウムなどの金属凝集法、プロタミンやポリエチレンジアミンなどの凝集法、さらにはDEAE (ジエチルアミノメチル)-セファロース、CM (カルボキシメチル)-セファロースなどのイオン交換クロマト法などにより精製することができ

る。このようにして得られたカタラーゼは通常、比活性100U/mg以上で得ることができる。

【0042】本発明に使用するペルオキシダーゼとしては、西洋ワサビをはじめとする植物や各種微生物由来のものがある。

【0043】本発明に使用する色原体としては、過酸化水素により分光学的に吸収の変化を生じさせるものであればいかなるものでもよい。ペルオキシダーゼの存在下、4-アミノアンチピリンとアニリン誘導体、4-アミノアンチピリンとフェノール誘導体、3-メチル-2-ベンゾチアゾリンとアニリン誘導体または4-アミノアンチピリン単独、アニリン誘導体単独、フェノール誘導体単独が考えられる。アニリン誘導体としては、アニリン、N、N-ジメチルアニリン、N、N-ジエチルアニリン、N、N-ジエチル-m-トルジジン、N、N-ジメチル-m-アニシジン、N-エチル-（3-メチルフェニル）-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-（β-ヒドロキシエチル）-m-トルイジン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホエチル）-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-スルホプロピル-3, 5-メトキシアニリン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-m-アニシジンなどがある。フェノール誘導体としては、フェノール、p-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノール、2, 4-ジブロモフェノール、2, 3, 4-トリクロロフェノールなどがある。

【0044】本発明では、まず、体液中の測定成分を測定するに当たり、体液中に含まれる妨害物質に、該妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素およびバチルス属のカタラーゼを作用させて、または該妨害物質から他の物質を誘導し、該物質に作用して過酸化水素を生成する酵素および該カタラーゼを作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去する。次いで、体液中の測定成分に、該測定成

第1試薬	クレアチンアミジノヒドロラーゼ	65U/ml
	ザルコシンオキシダーゼ	25U/ml
	カタラーゼ	120U/ml
	ペルオキシダーゼ	5U/ml
	PIPESバッファ	0.1M、pH6.8
	コール酸ナトリウム	0.1%
	トリトンX-100	0.1%
	EDTA	0.01%

【0050】

第2試薬	クレアチニンアミドヒドロラーゼ	200U/ml
	4-アミノアンチピリン	1.4mM
	EHSPT	2.0mM
	PIPESバッファ	0.1M、pH6.8

分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定する。

【0045】過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定する方法としては、生成したキノン色素の測定に、通常、540~650nmの波長の吸光度測定で行う。測定法としては、エンド法およびレート法で行う。

【0046】本発明の測定試薬は通常、2試薬系から成り、色原体が4-アミノアンチピリンまたは3-メチル-2-ベンゾチアゾリルノンヒドラジン等とアニリン誘導体またはフェノール誘導体から構成されている場合、その内の1種、好ましくはアニリン誘導体またはフェノール誘導体は、必ず第2試薬に含まれなければならないが、他の1種は第1試薬または第2試薬のどちらかに含まれていても良い。

【0047】本発明において2試薬系の場合には、第1試薬および第2試薬には前記成分に加えてペルオキシダーゼ、緩衝液および必要により測定成分に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素、ペルオキシダーゼ以外の酵素、これらの酵素の基質、界面活性剤、安定化剤、各種妨害物質等を含んでいても良い。ペルオキシダーゼは第1、第2試薬どちらに含まれても良いが、好ましくは第1試薬の方が良い。

【0048】

【発明の効果】本発明によって、長期保存性に優れた過酸化水素消去試薬が得られる。液状化試薬が主流である現在、これらのように液状で安定な試薬は非常に有用である。

【0049】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に示す。

#### 実施例1

クレアチニン測定試薬として、下記の溶液を作製した。

コール酸ナトリウム  
トリトンX-100  
EDTA

【0051】カタラーゼはバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) IAM1100より公知の方法により調製した。クレアチンをそれぞれ2、4、6、8mg/dlを含み、かつクレアチン1mg/dlを含む試料8μlを第1試薬300μlと混和し、37℃、5分間された後、555nmで吸光度を測定した(Abs1)。更に第2試薬100μlを混和し、37℃、5分間反応させ、555nmで吸光度を測定した(Abs2)。それぞれのAbs2-Abs1の値を5mg/dlのクレアチニン標準液の値と比較することによって、試料中のクレアチニン値を算出した(図1)。該試薬は8mg/dlまでのクレアチンの影響を受けず、試料中のクレアチンはクレアチニン、ザルゴシンオキシダーゼ、カタラーゼにより消去されていることが確認された。

#### 【0052】実施例2

実施例1で作製した第1試薬を25℃および40℃で保存して、1、2、3、4、7日目に残存カタラーゼ活性を測定した。なお、カタラーゼは以下の方法により作製した。16mM 過酸化水素溶液0.25mlを試験管に採り、25℃で5分間予備加熱し、酵素液0.25mlを加え、混和した。正確に5分間、25℃で保温した後、チタン試薬2.5mlを加え、反応を停止し、水を対照に410nmの吸光度を求めた(ODtest)。同時に過酸化水素溶液とチタン試薬2.5mlを混和し、25℃で5分間保温した後、酵素液を加えた(ODblank)。カタラーゼ1単位は1分間に1マイク

0.1%  
0.1%  
0.01%

ロモルの過酸化水素を分解する酵素量とした。その結果を図2に示す。

#### 【0053】比較例1

クレアチニン測定試薬として、実施例1の組成の溶液を作製した。ただし、カタラーゼとして市販の牛肝の酵素を用いた。その結果を図3に示す。

#### 10 【0054】比較例2

クレアチニン測定試薬として、実施例1の組成の溶液を作製した。ただし、カタラーゼとして市販のアスペルギルス属由来の酵素を用いた。本発明の結果を図2、比較例1の結果を図3、比較例2の結果を図4に示す。これらの図から明らかなように、バチルス属のカタラーゼは40℃、7日間の保存で、50%の残存活性を示すのに対して、牛肝由来のカタラーゼでは0%、アスペルギルス属由来のカタラーゼでは20%の残存活性を示すに過ぎず、バチルス属のカタラーゼのクレアチニン測定試薬中での安定性が示された。

#### 20 【図面の簡単な説明】

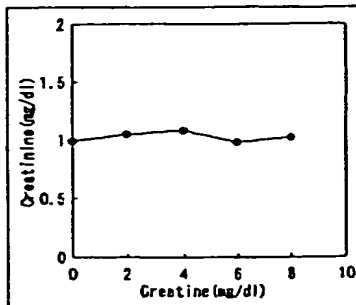
【図1】 本発明のクレアチニン測定試薬でのクレアチン消去能を示すグラフである。

【図2】 本発明のクレアチニン測定試薬中でのカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

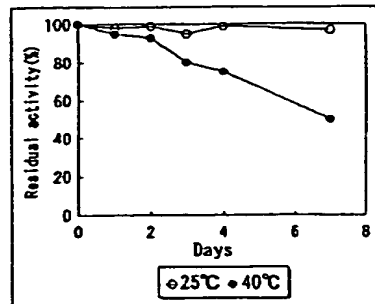
【図3】 クレアチニン測定試薬中での牛肝由来のカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

【図4】 クレアチニン測定試薬中でのアスペルギルス属由来のカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

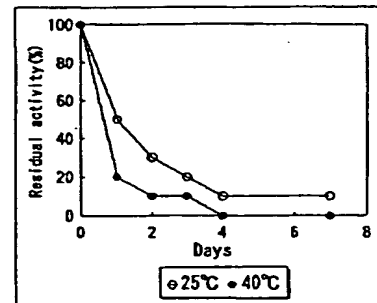
【図1】



【図2】



【図3】





## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10014596 A**(43) Date of publication of application: **20 . 01 . 98**

(51) Int. Cl. **C12Q 1/30**  
**C12Q 1/40**  
**C12Q 1/48**  
**C12Q 1/61**

(21) Application number: **08174795**(22) Date of filing: **04 . 07 . 96**(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**

(72) Inventor: **HATTORI SHIZUO**  
**MASUDA YOSHIO**  
**KAWAMURA YOSHIHISA**

(54) **MEASUREMENT OF COMPOSITION IN HUMOR  
AND REAGENT THEREFOR**

## (57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a reagent, capable of avoiding effects of an endogenous substance participating in an enzymic reactional system in a humor and accurately measuring the objective ingredient and excellent in stability.

**SOLUTION:** When a measuring ingredient in a humor are measured, an inhibiting substance contained in the humor is reacted with a reagent containing an enzyme capable of acting on the inhibiting substance or a substance derived from the inhibiting substance and producing hydrogen peroxide and a catalase of the genus *Bacillus* to scavenge the hydrogen peroxide produced from the

inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance. The measuring ingredient in the humor is then reacted with a reagent containing an enzyme capable of acting on the measuring ingredient and producing the inhibiting substance, an enzyme capable of acting on the inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance and producing the hydrogen peroxide, a peroxidase and a chromogen to produce the inhibiting substance from the measuring ingredient in the humor and further hydrogen peroxide from the inhibiting substance or the substance derived from the inhibiting substance and color the hydrogen peroxide. The coloring intensity thereof is then measured.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-14596

(43)公開日 平成10年(1998) 1 月20日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/30	9452-4B	C 1 2 Q	1/30
	1/40	9452-4B		1/40
	1/48	9452-4B		1/48
	1/61	9452-4B		1/61

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平8-174795	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成8年(1996)7月4日	(72)発明者	服部 静夫 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	増田 美穂 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	川村 良久 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54)【発明の名称】 体液中の成分の測定法およびその試薬

(57)【要約】

【解決手段】体液中の測定成分を測定するに当たり、体液に含まれる妨害物質に、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素およびバチルス属のカタラーゼを含む試薬を作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の測定成分に、該測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の測定成分の測定法およびその測定試薬。

【効果】体液中の酵素反応系に関与する内因性の物質の影響を回避して、目的成分を正確に測定することができる安定性に優れた試薬が得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中の測定成分を測定するに当たり、体液中に含まれる妨害物質に、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素およびバチルス属のカタラーゼを含む試薬を作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の測定成分に、該測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の測定成分の測定法。

【請求項2】 体液中のトリグリセリドを測定するに当たり、体液中に含まれるグリセリンにグリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グリセリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のトリグリセリドにリボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、トリグリセリドからグリセリンを生成させ、グリセリンからグリセロール-3-リン酸を生成させ、グリセロール-3-リン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のトリグリセリド測定法。

【請求項3】 体液中のクレアチニンを測定するに当たり、体液中に含まれるクレアチンにクレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、クレアチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のクレアチニンにクレアチンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、クレアチニンからクレアチンを生成させ、クレアチンからザルコシンを生成させ、ザルコシンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のクレアチニンの測定法。

【請求項4】 体液中のコレステロールエステルを測定するに当たり、体液中に含まれるコレステロールにコレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コレステロールから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のコレステロールエステルにリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、コレステロールエステルからコレステロールを生成させ、コレステロールから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の

コレステロールエステルの測定法。

【請求項5】 体液中のリン脂質を測定するに当たり、体液中に含まれるコリンにコリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のリン脂質にホスホリパーゼD、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、リン脂質からコリンを生成させ、コリンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のリン脂質の測定法。

【請求項6】 体液中の無機リンを測定するに当たり、体液中に含まれるヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ヒポキサンチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の無機リンにイノシンおよびプリンスクレオチドフォスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、無機リンからヒポキサンチンを生成させ、ヒポキサンチンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の無機リンの測定法。

【請求項7】 体液中のGPTを測定するに当たり、体液中に含まれるビルビン酸にビルビン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ビルビン酸から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のGPTにL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、GPTからビルビン酸を生成させ、ビルビン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のGPTの測定法。

【請求項8】 体液中の $\alpha$ -アミラーゼを測定するに当たり、体液中のグルコースにグルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グルコースから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の $\alpha$ -アミラーゼにアミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、 $\alpha$ -アミラーゼからグルコースを生成させ、グルコースから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定法。

【請求項9】 体液中に含まれる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含有する第1試薬および体液中の測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含有する第2試薬からなる体液中の測定成分測定試薬。

【請求項10】 グリセロールキナーゼ、グリセロール

ー3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のトリグリセリド測定試薬。

【請求項11】 クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のクレアチニンの測定試薬。

【請求項12】 コレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のコレステロールエステルの測定試薬。

【請求項13】 コリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびホスホリパーゼD、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のリン脂質の測定試薬。

【請求項14】 キサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびイノシンおよびプリンヌクレオチドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の無機リンの測定試薬。

【請求項15】 ビルビン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなるGPTの測定試薬。

【請求項16】 グルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬および $\alpha$ -アミラーゼ\*

LPL

GK

G30

トリグリセリド → グリセロール → グリセロリン酸 →  $H_2O_2$

【0005】 クレアチニン測定

CNH

CRH

SAO

クレアチニン → クレアチン → ザルコシン →  $H_2O_2$

【0006】 コレステロールエステル測定

COE

COO

コレステロールエステル → 遊離コレステロール →  $H_2O_2$

【0007】 リン脂質測定

PLD

CHO

リン脂質 → コリン →  $H_2O_2$

【0008】 無機リン測定

PNP

XTO

無機リン + イノシン → ヒポキサンチン →  $H_2O_2$

【0009】 上記式にて、略記した酵素は、以下の通りである。

LPL : リポプロテインリパーゼ

GK : グリセロールキナーゼ

G30 : グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ

50 CNH : クレアチニンアミドヒドロラーゼ (クレアチニナ

\* 基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は試料中に存在する分析対象物から過酸化水素を生成し、生成した過酸化水素を測定することにより、分析対象物を検出する方法において、分析対象物以外の物質（妨害物質）に由来する過酸化水素をカタラーゼを用いて消去した後、分析対象物を検出する方法および該方法に使用する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 体液などの試料中の分析対象物を酵素を用いて検出する場合、その検出反応系は脱水素酵素を補酵素であるNAD(P)Hとを共役させる反応系と、酸化酵素とペルオキシダーゼを共役させる過酸化水素測定系が一般的に多い。後者は分析対象物またはその反応生成物に酸化酵素を作用させ、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと色原体により、例えばキノンイミン色素に変え、該色素を吸光度測定して比色定量する方法である。また、分析対象物を検出する場合、その分析対象物に直接、酸化酵素を作用させる場合もあるが、多くの場合は、酸化酵素およびペルオキシダーゼの他に、更に1種類以上の他の酵素を必要とする。

【0003】 分析対象物に酸化酵素の他に1種類以上の他の酵素を必要とする例として、トリグリセリド、クレアチニン、クレアチン、遊離コレステロール、コレステロールエステル、リン脂質、無機リン、アミラーゼ、GOT、GTP、シアル酸、グアナーゼなどが挙げられる。

【0004】 上記分析対象物の反応を下記に示す。

グリグリセリド測定



ーゼ)

CRH : クレアチンアミジノヒドロラーゼ (クレアチナーゼ)

SAO : ザルコシンオキシダーゼ

COE : コレステロールエステラーゼ

COO : コレステロールオキシダーゼ

PLD : ホスホオリパーゼ D

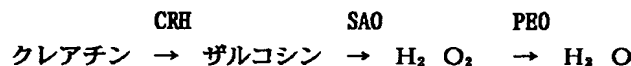
CHO : コリンオキシダーゼ

PNP : プリンヌクレオチドホスホオリラーゼ

XTO : キサンチンオキシダーゼ

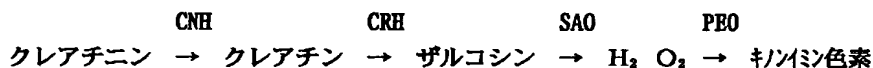
【0010】これらの分析対象物を含む試料、例えば体液中には上記酵素反応系に関与する内因性の物質が存在し、目的の分析対象物の測定に正の誤差を生じることが問題となる。例えばトリグリセリドを測定する場合、遊離グリセロール、クレアチニンを測定する場合、クレアチンおよびザルコシン、エステル型コレステロールを測定する場合、遊離コレステロール、リン脂質を測定する場合、コリン、無機リンを測定する場合、ヒポキサンチン、アミラーゼ活性を測定する場合、グルコース、GOTまたはGTP活性を測定する場合、ビルビン酸、シアル酸を測定する場合、ビルビン酸、グアナーゼを測定する場合、尿酸などが例示される。

【0011】例えばクレアチニン測定では、クレアチニン、特に血中クレアチニン濃度は腎機能傷害の指標であり、また、尿中クレアチニン濃度は体重1kgあたりに\*



【0014】次いで第2酵素反応として、試薬R2を試料および試薬R1の系に添加して、添加し、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ※30

※ゼ、ザルコシンオキシダーゼ、カタラーゼ、色原体およびペルオキシダーゼの反応により、試料中のクレアチニンから有色物質を生成し、該物質を比色定量する。



【0015】第2酵素反応に共存するカタラーゼは、そのカタラーゼ阻害剤を添加することにより該酵素反応をブロックできるが、一般にカタラーゼをペルオキシダーゼの1~10倍(活性値)で使用するにより検出感度を低下させずに目的を達成することができる。クレアチニンと同様にトリグリセリド、無機リン測定などの検出においても同様に分析対象物以外に由来する過酸化水素の消去が必要とされる。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】上記目的に使用されるカタラーゼとしては、従来から牛肝の酵素が多く使用されている。しかしながら、牛肝由来のカタラーゼは熱安定性が50℃であって、良好な性質を有するが、分析試薬の組成中では急速に失活することが判明している。また、他の動物起源のカタラーゼ、微生物由来のカタラーゼも牛肝由来の酵素と同様に分析試薬中で速やかに失活する。

【0017】

\*換算すると食事、運動等に影響を受けず一定であるのでクレアチニン係数として利用されている。ところがクレアチニンにクレアチニンアミドヒドロラーゼが作用して生成するクレアチンも生体内に存在し、特にクレアチン濃度は他の疾患、例えば甲状腺機能傷害に関与するのでクレアチニンを測定する場合、あらかじめクレアチンを消去しておく必要性が生じる。内因性のクレアチンを消去するために、カタラーゼを用いた2試薬系のクレアチニン測定用試薬が知られている(特公平4-34400号公報)

10

【0012】クレアチニン測定試薬としては、例えば下記組成を有するものが挙げられる。

試薬R1 : クレアチンアミジノヒドロラーゼ

ザルコシンオキシダーゼ

カタラーゼ

ペルオキシダーゼ

試薬R2 : クレアチニンアミドヒドロラーゼ

(ペルオキシダーゼ)

色原体

20

【0013】つまり、試薬R1に用いる第1酵素反応で、試料中のクレアチンをクレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、カタラーゼおよびペルオキシダーゼの反応により無色の物質に変換して消去する。

40

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、バチルス属に属する細菌由来のカタラーゼを用いると、分析試薬の組成中でも安定に活性を保持していることが判明した。

【0018】すなわち、本発明は体液中の測定成分を測定するに当たり、体液に含まれる妨害物質に、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含む試薬を作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の測定成分に、該測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の測定成分の測定法であ

50

る。

【0019】また、本発明は体液中に含まれる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素およびバチルス属のカタラーゼを含有する第1試薬および体液中の測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含有する第2試薬からなる体液中の測定成分測定試薬である。

#### 【0020】

【発明の実施態様】本発明の一実施態様は、体液中のトリグリセリドを測定するに当たり、体液中に含まれるグリセリンにグリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グリセリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のトリグリセリドにリポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、トリグリセリドからグリセリンを生成させ、グリセリンからグリセロール-3-リン酸を生成させ、グリセロール-3-リン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のトリグリセリド測定法である。

【0021】上記方法に使用する試薬としては、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリポプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のトリグリセリド測定試薬がある。

【0022】また、本発明の別な実施態様は、体液中のクレアチニンを測定するに当たり、体液中に含まれるクレアチンにクレアチンアミジノヒドrolラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、クレアチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のクレアチニンにクレアチニンアミドヒドrolラーゼ、クレアチンアミジノヒドrolラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、クレアチニンからクレアチンを生成させ、クレアチンからザルコシンを生成させ、ザルコシンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のクレアチニンの測定法である。

【0023】上記方法に使用する試薬としては、クレアチンアミジノヒドrolラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびクレアチニンアミジノヒドrolラーゼ、クレアチンアミジノヒドrolラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダー

ゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のクレアチニンの測定試薬がある。

【0024】さらに、本発明の一実施態様は、体液中のコレステロールエステルを測定するに当たり、体液中に含まれるコレステロールにコレステロールオキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コレステロールから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のコレステロールエステルにリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、コレステロールエステルからコレステロールを生成させ、コレステロールから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のコレステロールエステルの測定法である。

【0025】上記方法に使用する試薬としては、コレステロールにコレステロールオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のコレステロールエステルの測定試薬がある。

【0026】本発明の別な実施態様は、体液中のリン脂質を測定するに当たり、体液中に含まれるコリンにコリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、コリンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のリン脂質にホスホリパーゼD、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、リン脂質からコリンを生成させ、コリンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のリン脂質の測定法である。

【0027】上記方法に使用する試薬としては、コリンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびホスホリパーゼD、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中のリン脂質の測定試薬がある。

【0028】また、本発明の一実施態様は、体液中の無機リンを測定するに当たり、体液中に含まれるヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ヒポキサンチンから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の無機リンにイノシンおよびプリンヌクレオチドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、無機リンからヒポキサンチンを生成させ、ヒポキサンチンから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の無機リンの測定法である。

【0029】上記方法に使用する試薬としては、キサンチンオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびイノシンおよびプリンヌクレオチドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダー

10

20

30

40

50

一ゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の無機リンの測定試薬がある。

【0030】本発明の別な実施態様は、体液中のGPTを測定するに当たり、体液中に含まれるビルビン酸にビルビン酸オキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを作用させて、ビルビン酸から生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中のGPTにL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、GPTからビルビン酸を生成させ、ビルビン酸から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中のGPTの測定法である。

【0031】上記方法に使用する試薬としては、ビルビン酸オキシダーゼ、およびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬およびL-アラニン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなるGPTの測定試薬がある。

【0032】本発明の一実施態様は、体液中の $\alpha$ -アミラーゼを測定するに当たり、体液中のグルコースにグルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを作用させて、グルコースから生成した過酸化水素を消去した後、次いで体液中の $\alpha$ -アミラーゼにアミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を作用させて、 $\alpha$ -アミラーゼからグルコースを生成させ、グルコースから過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定することを特徴とする体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定法である。

【0033】上記方法に使用する試薬としては、グルコースオキシダーゼおよびバチルス属のカタラーゼを含む第1試薬および $\alpha$ -アミラーゼ基質、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む第2試薬からなる体液中の $\alpha$ -アミラーゼ測定試薬がある。基質としては、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘプタオースなどのオリゴ糖やそれらの非還元末端修飾オリゴ糖などがある。

【0034】本発明における試料としては、尿、血清、唾液、脾液などの体液がある。また、分析対象物としては、その試料中に対象物以外の物質に起因して過酸化水素を発生するものを含有するものであれば、何でも適用可能である。例えばクレアチニン、トリグリセリド、無機リンが代表的であるが、他にクレアチン、コレステロールエステル、シアル酸、 $\alpha$ -アミラーゼ、GOT、GPT、グアナーゼ、リン脂質などを挙げることができる。

【0035】本発明に用いる妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素としては、例えばコレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼなどがある。

【0036】本発明において妨害物質に由来する物質と

は、妨害物質に酵素または基質および他の物質を作用させて生成する物質であって、該物質は該物質に作用する酵素によって過酸化水素を生成するものである。例えばグリセロール-3-リン酸、ザルコシン、キサンチンなどが挙げられる。

【0037】本発明において妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素としては、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウリカーゼ、グリセロールオキシダーゼなどがあり、過酸化水素を発生する酸化酵素であれば、いかなる起源のものでも良い。

【0038】本発明に使用する測定成分に作用して妨害物質を生成する酵素としては、グリロキナーゼ、リパーゼ、リボプロテインリパーゼ、ホスフォリパーゼD、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、プリンヌクレオチドフォスフォリラーゼなどが挙げられる。

【0039】本発明に使用するカタラーゼは、その起源としてバチルス属細菌であれば、いかなる起源のものを用いても良い。特に好適なのはバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・カルドテナックス (*Bacillus cardotenax*) 由来のものがある。これらの中でもバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) IF012550、IF012983、IF013737、ATCC12016、IAM11001由来のものが特に好ましい。

【0040】本発明に用いるカタラーゼは、例えば好適なバチルス・ステアロサーモフィラスを培養し、該培養物から精製する。このような方法としては、例えば特開昭63-207384号公報に記載される方法がある。カタラーゼ生産菌の培養にあたって使用する培地としては、使用菌株が資化しうる炭素源、窒素源、その他必要な栄養素を適量含有するものを、合成培地、天然培地のいずれかであっても使用できる。培養は通常、振とう培養あるいは通気攪拌培養で行い、培養温度は40~60℃、培養pHは5~9の範囲で行う。培養期間は1~5日で生育し、菌体内にカタラーゼが生産蓄積される。

【0041】本発明に使用するカタラーゼの精製法は、例えば以下の様にして行うことができる。菌体からの抽出法として、超音波破碎、ガラスビーズなどを用いる機械的な破碎、フレンチプレス、界面活性剤処理が挙げられる。さらに抽出液については、硫酸やばう硝などの塩析法、塩化マグネシウムや塩化カルシウムなどの金属凝集法、プロタミンやポリエチレンイミンなどの凝集法、さらにはDEAE (ジエチルアミノメチル) -セファロース、CM (カルボキシメチル) -セファロースなどのイオン交換クロマト法などにより精製することができ

る。このようにして得られたカタラーゼは通常、比活性100U/mg以上で得ることができる。

【0042】本発明に使用するペルオキシダーゼとしては、西洋ワサビをはじめとする植物や各種微生物由来のものがある。

【0043】本発明に使用する色原体としては、過酸化水素により分光学的に吸収の変化を生じさせるものであればいかなるものでもよい。ペルオキシダーゼの存在下、4-アミノアンチピリンとアニリン誘導体、4-アミノアンチピリンとフェノール誘導体、3-メチル-2-ベンゾチアゾリンとアニリン誘導体または4-アミノアンチピリン単独、アニリン誘導体単独、フェノール誘導体単独が考えられる。アニリン誘導体としては、アニリン、N、N-ジメチルアニリン、N、N-ジエチルアニリン、N、N-ジエチル-m-トルジン、N、N-ジメチル-m-アニシジン、N-エチル-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジンなどがある。フェノール誘導体としては、フェノール、p-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,4-ジブROMフェノール、2,3,4-トリクロロフェノールなどがある。

【0044】本発明では、まず、体液中の測定成分を測定するに当たり、体液中に含まれる妨害物質に、該妨害物質に作用して過酸化水素を生成する酵素およびパチルス属のカタラーゼを作用させて、または該妨害物質から他の物質を誘導し、該物質に作用して過酸化水素を生成する酵素および該カタラーゼを作用させて、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から生成した過酸化水素を消去する。次いで、体液中の測定成分に、該測定成

\* 分に作用して妨害物質を生成する酵素、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質に作用して過酸化水素を生成する酵素、ペルオキシダーゼおよび色原体を含む試薬を作用させて、体液中の測定成分から妨害物質を生成させ、該妨害物質または該妨害物質に由来する物質から過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定する。

【0045】過酸化水素を発色させた後、その発色強度を測定する方法としては、生成したキノン色素の測定に、通常、540~650nmの波長の吸光度測定で行う。測定法としては、エンド法およびレート法で行う。

【0046】本発明の測定試薬は通常、2試薬系から成り、色原体が4-アミノアンチピリンまたは3-メチル-2-ベンゾチアゾリルノンヒドラジン等とアニリン誘導体またはフェノール誘導体から構成されている場合、その内の1種、好ましくはアニリン誘導体またはフェノール誘導体は、必ず第2試薬に含まれなければならないが、他の1種は第1試薬または第2試薬のどちらかに含まれていても良い。

【0047】本発明において2試薬系の場合には、第1試薬および第2試薬には前記成分に加えてペルオキシダーゼ、緩衝液および必要により測定成分に作用して過酸化水素を生成する酸化酵素、ペルオキシダーゼ以外の酵素、これらの酵素の基質、界面活性剤、安定化剤、各種妨害物質等を含んでいても良い。ペルオキシダーゼは第1、第2試薬どちらに含まれても良いが、好ましくは第1試薬の方が良い。

【0048】

【発明の効果】本発明によって、長期保存性に優れた過酸化水素消去試薬が得られる。液状化試薬が主流である現在、これらのように液状で安定な試薬は非常に有用である。

【0049】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に示す。

#### 実施例1

クレアチニン測定試薬として、下記の溶液を作製した。

第1試薬	クレアチンアミジノヒドロラーゼ	65U/ml
	ザルコシンオキシダーゼ	25U/ml
	カタラーゼ	120U/ml
	ペルオキシダーゼ	5U/ml
	PIPESバッファー	0.1M、pH6.8
	コール酸ナトリウム	0.1%
	トリトンX-100	0.1%
	EDTA	0.01%

【0050】

第2試薬	クレアチニンアミドヒドロラーゼ	200U/ml
	4-アミノアンチピリン	1.4mM
	EHSPT	2.0mM
	PIPESバッファー	0.1M、pH6.8

コール酸ナトリウム  
トリトンX-100  
EDTA

0.1%  
0.1%  
0.01%

【0051】カタラーゼはバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) IAM11001より公知の方法により調製した。クレアチンをそれぞれ2、4、6、8mg/dlを含み、かつクレアチン1mg/dlを含む試料8μlを第1試薬300μlと混和し、37℃、5分間された後、555nmで吸光度を測定した(Abs1)。更に第2試薬100μlを混和し、37℃、5分間反応させ、555nmで吸光度を測定した(Abs2)。それぞれのAbs2-Abs1の値を5mg/dlのクレアチニン標準液の値と比較することによって、試料中のクレアチニン値を算出した(図1)。該試薬は8mg/dlまでのクレアチンの影響を受けず、試料中のクレアチンはクレアチニン、ザルコシンオキシダーゼ、カタラーゼにより消去されていることが確認された。

#### 【0052】実施例2

実施例1で作製した第1試薬を25℃および40℃で保存して、1、2、3、4、7日目に残存カタラーゼ活性を測定した。なお、カタラーゼは以下の方法により作製した。16mM 過酸化水素溶液0.25mlを試験管に採り、25℃で5分間予備加温し、酵素液0.25mlを加え、混和した。正確に5分間、25℃で保温した後、チタン試薬2.5mlを加え、反応を停止し、水を対照に410nmの吸光度を求めた(ODtest)。同時に過酸化水素溶液とチタン試薬2.5mlを混和し、25℃で5分間保温した後、酵素液を加えた(ODblank)。カタラーゼ1単位は1分間に1マイク\*30

\*ロモルの過酸化水素を分解する酵素量とした。その結果を図2に示す。

#### 【0053】比較例1

クレアチニン測定試薬として、実施例1の組成の溶液を作製した。ただし、カタラーゼとして市販の牛肝の酵素を用いた。その結果を図3に示す。

#### 【0054】比較例2

クレアチニン測定試薬として、実施例1の組成の溶液を作製した。ただし、カタラーゼとして市販のアスペルギルス属由来の酵素を用いた。本発明の結果を図2、比較例1の結果を図3、比較例2の結果を図4に示す。これらの図から明らかなように、バチルス属のカタラーゼは40℃、7日間の保存で、50%の残存活性を示すのに対して、牛肝由来のカタラーゼでは0%、アスペルギルス属由来のカタラーゼでは20%の残存活性を示すに過ぎず、バチルス属のカタラーゼのクレアチニン測定試薬中での安定性が示された。

#### 【図面の簡単な説明】

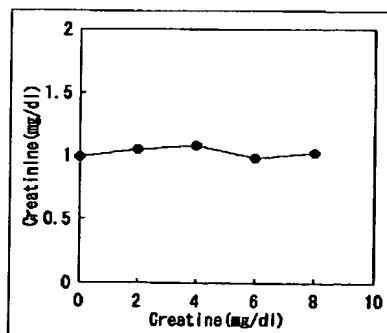
【図1】 本発明のクレアチニン測定試薬でのクレアチン消去能を示すグラフである。

【図2】 本発明のクレアチニン測定試薬中でのカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

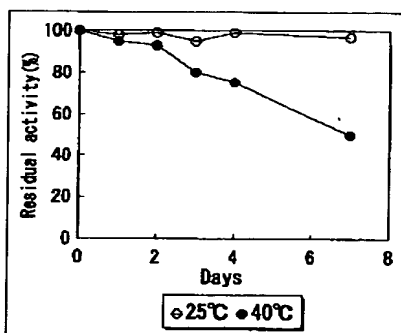
【図3】 クレアチニン測定試薬中での牛肝由来のカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

【図4】 クレアチニン測定試薬中でのアスペルギルス属由来のカタラーゼ保存安定性を示すグラフである。

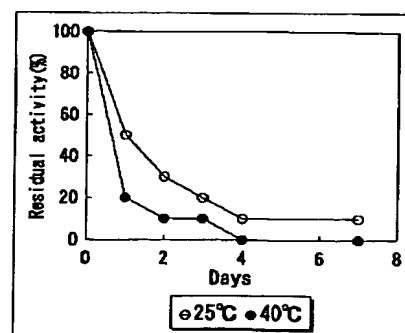
【図1】



【図2】



【図3】



【図 4】

